

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-505007

(P2002-505007A)

(43) 公表日 平成14年2月12日 (2002.2.12)

(51) Int.Cl.¹

G 0 1 N 27/414
27/333

識別記号

F I

G 0 1 N 27/30

テマコード (参考)

3 0 1 K
3 3 1 E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平11-503957
(86) (22) 出願日 平成10年6月15日 (1998.6.15)
(85) 翻訳文提出日 平成11年12月13日 (1999.12.13)
(86) 国際出願番号 PCT/GB98/01738
(87) 国際公開番号 WO98/58248
(87) 国際公開日 平成10年12月23日 (1998.12.23)
(31) 優先権主張番号 9712386
(32) 優先日 平成9年6月14日 (1997.6.14)
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

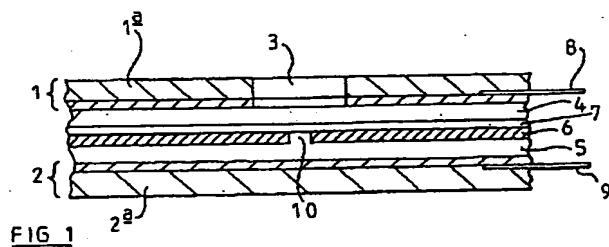
(71) 出願人 コベントリー ユニバーシティ
英国、コベントリー シーブイ1 5エフ
ビー、プライオリー ストリート (無番
地)
(72) 発明者 ピーターソン・イアン・ロバート
英国、ワーウィックシャー シーブイ8
1ジェイビー、ケニルワース、ベルティー
ロード 1
(74) 代理人 弁理士 鈴木 守三郎 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲート・イオンチャネルを含む脂質膜から成るバイオセンサー

(57) 【要約】

バイオセンサーは、脂質膜 (7) の最初の面に塗布され
るサンプルの分析分子の存否を感知しうるゲート・イオ
ンチャネルを含む脂質膜 (7) を持つ。脂質膜 (7) は、
多孔質ゲル (4) の最初の層が脂質膜 (7) の最初
の面に塗布される一対の電極 (1, 2) の間に配置され
る。



【特許請求の範囲】

1. 多孔質ゲルの最初の層が脂質膜の最初の面に塗布される、一対の電極の間に配置された脂質膜の最初の面に塗布されるサンプルの分析分子の存否を感知しうるゲート・イオンチャネルを含む脂質膜から成るバイオセンサー。
2. ゲルの二番目の層が脂質膜の二番目の面に塗布される、請求の範囲1に記載のバイオセンサー。
3. ゲルがヒドロゲルである、上記各請求の範囲の何れかに記載のバイオセンサー。
4. ゲルの最初の層が、約1kDの生体分子の拡散を5分未満で起こさせうるよう、上記各請求の範囲の何れかに記載のバイオセンサー。
5. 脂質膜の脂質がC₁₂₋₂₂の鎖長さの炭化水素尾部を持つ、上記各請求の範囲の何れかに記載のバイオセンサー。
6. 二つの平面電極のそれぞれに一層の多孔質ゲルを塗布し、脂質溶液を二番目のゲル層にかけ、次に一つの電極を他方の上にのせて、ゲル層がそれらの間に配置されて脂質膜で分離されるようにすることから成るバイオセンサー組み立て法。
7. 脂質膜形成の前に、ゲート・イオンチャネルを定義する膜形成脂質と分子を溶媒で溶かす、請求の範囲6に記載の方法。
8. 溶媒がクロロホルムである、請求の範囲7に記載の方法。
9. 脂質膜の形成の前に、ゲート・イオンチャネルを定義する膜形成脂質と分子が、アルカンに富む連続相の転相乳剤に組み込まれる、請求の範囲6に記載の方法。
10. このアルカンがヘキサンである、請求の範囲9に記載の方法。
11. 請求の範囲1～5に記載の何れかのバイオセンサーで多孔質ゲルの最初の層にサンプルを塗布することから成る、サンプルの分析分子を定質的・定量的に測定する方法。

【発明の詳細な説明】

ゲート・イオンチャネルを含む脂質膜から成るバイオセンサー

本発明は、バイオセンサー、とりわけ脂質膜を通るイオンの輸送を検知もしくは測定することにより動作するタイプのバイオセンサーに関するものである。

二重層膜に及ぶゲート・チャネル・タンパク質の使用に基づくバイオセンサーには、かなり関心がある。実際的な測定間隔中に個々の結合イベントは、このチャネルを通じて 10^9 イオンもの通過をもたらすことができる。また、異なるチャネルの動作は基本的に独立しており、またそれらを通る電流は直線的に結合する。これら二つのファクターは、卓越した感度と高いダイナミック・レンジを示す生体分子を感知するための一般原理の有望さを示唆する。

高いダイナミック・レンジを達成するためには、ターゲット生体分子が存在すると開くチャネル・タンパク質を選ぶ必要がある。これは、多くの自然生成チャネル・タンパク質、一般的には神経細胞の神経伝達物質受容体の場合である。より一般的にあてはまるアプローチでは、頑強なゲートなしチャネルとりわけグラミシジンは、普通にはチャネルを妨害し、また抗原が結合するときにその妨害を解除するように、抗体分子に化学的に結合する。

こうしたチャネル・タンパク質を通じて輸送される電荷は、物理的に溶媒和イオン (solvated ions) から成る。さらなる処理ができるようにするために、二重層の前後に電極のワイヤを通じて、イオンを電子の流れと交換しなければならない。或る既知のアプローチでは、二重層は後ろの貴金属電極のすぐ近くにある。イオンがどこに流れのか不明である。もしイオンが電極で放出されるなら、関連する化学変化が必然的に劣化に導くだろう。

別の既知のアプローチでは、ゲルに含まれる二重層の後ろに電解質がある。二重層は、ゲルに隣接した開口部を通す標準技術で作られる。二重層が試験液の非常に強い攪拌に耐えることができるよう、ゲルが二重層を物理的に少し支えている。しかしひ重層は脱水できず、モニターする水性媒体で測定する直前に形成しなければならない。それは媒体に直接にさらされ、固体との接触に耐えることができない。

既知の形態のそうしたバイオセンサーの欠点を克服もしくはかなり緩和する脂質膜を通るイオン輸送の測定に基づいて、新しい形態のバイオセンサーが考案された。

本発明の第1の態様によれば、バイオセンサーは、脂質膜の最初の面に塗布されるサンプルの分析分子の存否を感知しうるゲート・イオンチャネルを含む脂質膜から成り、その脂質膜は一対の電極の間に配置され、そこでは多孔質ゲルの最初の層が脂質膜の最初の面に塗布される。

本発明によるバイオセンサーは主として、脂質膜に塗布される多孔質ゲルの最初の層が膜を物理的接触で生じる物理的損傷と乾燥から守り、しかもサンプルに含まれる分子が脂質膜にアクセスできるようにするという点でメリットがある。バイオセンサーの乾燥によって膜がだいなしになることがないので、バイオセンサーを乾燥状態で包装して貯蔵し、使用直前に再水和させることができる。

膜をより一層保護して隣接電極からの必要な分離をし、さらにその電極が必要とするイオンをたくわえておくために、脂質膜の二番目の面に二番目のゲル層を塗布することが望ましい。

このゲルは、生体親和性のある多孔質ゲルが望ましく、最も望ましいのはヒドロゲルである。適切なゲル材料としては、アガロース、デキストラン、カラゲナン、アルギン酸、でんぶん、セルロース、もしくはカルボキシメチル誘導体等のこれらの誘導体、あるいはポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコールなどの吸水膨張性有機ポリマーなどがある。特に望ましいゲル材料はアガロースである。

る。とりわけ適切と考えられるその他のゲル材料には、ポリアクリルアミド・ゲルが含まれる。

とりわけ最初のゲル層の厚みは、約1kDの生体分子の拡散が比較的短時間、たとえば5分未満で生じる程度が望ましく、より望ましいのは2分未満である。最初のゲル層と二番目のゲル層の厚みは5mm未満が望ましく、できれば0.1~2mm、最も望ましいのは約1mmである。

脂質膜は、二重層の両親媒性分子が望ましく、最も望ましいのはホスファチジ

ルコリンやホスファチジルエタノールアミンのような一以上のリン脂質である。この脂質は鎖の長さがC₁₂～C₂₂の炭化水素の尾を持つことができ、最も望ましいのはC₁₂～C₁₈である。特に望ましいリン脂質はジオレイルホスファチジルコリンである。その他の使用可能な膜形成分子には、親水基を持つ疎水性ポリマー・チェーンなどの両親媒性ポリマーが含まれる。こうしたポリマーの一例は、ホスファチジルコリン基を持つポリシロキサンである。

たとえば膜結合タンパク質のような、ゲート・イオンチャネルを定義する適切な分子が、脂質膜に組み込まれる。

脂質膜と二番目のゲル層の間に、不活性で不透過性材料の有孔シートをはさむことが望ましい。それに適した材料は、ポリテトラフルオロエチレンである。このシートの厚みは、たとえば約100μm未満と薄い方が望ましく、より好ましい厚みは約10μmである。このシートは、直径10～200μmの穴が一以上あるものが望ましく、直径が50～100μm程度であればより好ましい。この材料のシートにより、シートの穴の部分でのみ電極間に電流が流れる。

脂質膜は、ゲート・イオンチャネルを定義する分子と膜形成脂質を溶媒で溶かし、そして作られた溶液を二番目のゲル層（か二番目のゲル層に接する不活性材料の有孔シート）に塗布することによって作ることができる。水との実質的な不混和性を条件として、適切なあらゆる溶媒を使うことができる。水素結合を開始する能力のある極性溶媒が好ましい。という

のは、それを使うことによって溶液の表面を完全にカバーするための強力な駆動力が得られるからである。特に好ましい溶媒はクロロホルムである。この溶液の濃度は、0.01～5%w/vが望ましく、たとえば約0.2%w/vのように1%w/v未満がより望ましい。

しかし、上記の脂質膜形成法は必ずしも妥当ではないかも知れない。たとえばいくつかの配位子ゲート・チャネル・タンパク質はクロロホルムで変性する可能性がある。こうした場合に妥当な脂質膜の別の形成法には、ゲート・イオンチャネルを定義する分子と膜形成脂質を含む転相ミセル溶液か乳剤を作ることが伴い、ミセル溶液や乳剤は炭化水素連続相を持つ。望ましい炭化水素はアルカンだが

、ヘキサンが最も望ましい。

すぐ上のパラグラフで述べた別の形成法があてはまる可能性のある一つの機能的配位子ゲート・チャネル・タンパク質は、ニコチン性アセチルコリン受容体 ($nAChR-G.Puu$ 等のBiosens, Bioelectron.10(1995), 463を参照) である。わずかな変型が数多くあるこの神経受容体は神経系を持つほとんどの動物に見られ、非常に豊富な供給源は普通の大理石模様のエイ *Torpedo marmorata* の電気器官にある。エイの電気器官を均質化し、膜結合留分を分離するために C₅C₁ グラディエントで遠心分離することによって得られる生のエキスは、基本的に水様の連続相を持つ。水の割合を減らすことによって、乳剤を転相し、脂質膜を作るのに必要な特性を持つ炭化水素連続相の転相乳剤をそれから作ることが可能である。

電極は、一般的に従来の形の貴金属電極が望ましい。最も好ましい電極は、雲母などの適切な基板のシート上に形成された銀／塩化銀の電極である。脂質膜の最初の面にある電極には、サンプル挿入ポートの役目をする開口部を作るのが望ましい。そのデバイスが上記のような有孔材料シートから成る場合には、開口部は穴と一直線になることが望ましい。

本発明はさらに、サンプルの分析分子を定性的・定量的に測定する方法を提供し、この方法は、本発明の最初の側面に準拠したバイオセンサーで多孔質ゲルの最初の層にサンプルを塗布することから成る。

本発明のバイオセンサーは、一層の多孔質ゲルを二つの平面電極のそれぞれに塗布し、脂質分子を含む溶液か乳剤を二番目のゲル層にかけ、次にゲル層が間に配置されるように一方の電極を他方の電極の上にのせることによって組み立てることが最も望ましい。一般にバイオセンサーは、脂質膜が自然に形成されるような条件下で組み立てられる。単一層の脂質は、溶液か乳剤とそれぞのゲル層の間の界面で形成される。大部分の溶液か乳剤はゲル層の間から噴出するか蒸発するので、これら二つの単一層が一緒になって脂質膜二重層が形成される。

本発明の望ましい具体的記述は、これから添付の図に関する例のみを使って詳細におこなう。

図1は、本発明に準拠したバイオセンサー・セルの側面断面の概略図である。

図2は、脂質二重層付きとなしの、図1で示したタイプのセルを使って測定したセル抵抗（対数抵抗目盛り）の柱状図を示す。

図3は、グラミシジンに長期にわたってさらした後に図1のセルを使って測定したセル抵抗（対数目盛り）の、抵抗がその究極の値に達するのにかかる時間に対する散布図を示す。

まず図1に関して、本発明に準拠したバイオセンサー・セルが、下記のように雲母基板1aと2a上に形成された一对の平面の銀／塩化銀電極の間に形成される。上方の雲母基板1aには、テスト・サンプルを差し込むことのできる直径3mmの開口部3が1個ある。電極1と2の間の空間は、脂質二重層7が形成される上面上の厚さ10μmのPTFEシートで分離される（下記の記述通りに調製される）アガロース・ゲルの一番目と二番目の層4と5で満たされる。シート6には、穴10が一以上あけてある。銀のワイヤ8と9は、電極1と2に接続される。

ゲル・シートの形成

重量で1%のアガロース、重量で10%のグリセロール、0.1Mの塩化ナトリウム、0.1Mの塩化カリウム、0.01Mの塩化カルシウム、

および残りの超純水の混合物を沸点まで加熱した。まだ液体の間にその混合物をピペットで親水性のグラス・モールドか表面（一般に6ml）に移して、固まるまで放置した。

ゲル・シート4と5は、最初にできたときには厚さ1mmだった。それらは、大気層流（公称23℃、相対湿度50%）の下で完全に乾燥するまで放置された。電解質（超純水中の0.1M塩化ナトリウム、0.1M塩化カリウム、0.01M塩化カルシウム）による再水和の後に、ゲルをその基板から取り除いた。

電極の形成

銀／塩化銀の電極1と2は以下のように作られた。新しく裂いた雲母片1aと2aに必要な穴をあけた（一般に数センチメートルのサイズの雲母片に直径3mmの穴）。それらを水洗いして、クロロホルムとメタノールで別々に音波破碎した。直径12.5μmの銀線8と9を表面にのせて、次にそれに銀のコーティングをほどこし、放置して乾燥させ、銀線8と9を固定した。はじめに10sの陰極

として、次にさらに10 sの陽極として、ステンレススチールの対電極を使って9 Vで1 Mの塩化水素で電気分解して、表面を塩化物処理した。上記パラグラフで述べた再水和ゲル層4と5は、銀の面と接触させて置かれた。

バイオセンサー・セルの組み立て

厚さ10 μ mのPTFEフィルム6をセンチメートル・サイズの切片にして、赤熱タングステンの先端で穴を開けた。その結果得られた穴は、一般的に直径50～100 μ mだった。

クロロホルム1リットル当たり20 gの濃度のL, α -ジオレイルホスファチジルコリンから、展布溶液が作られた。

図1で示された構造物を、以下のように組み立てた。穴を開けたPTFE片6を、ゲル・コーティング5をほどこした下部電極2にのせた。展布溶液10 μ lをPTFE6に散布し、ゲル・コーティング4をほどこした二番目の開口電極1を上にのせ、開口部3がPTFEシート6の穴と一直線にな

るようにした。

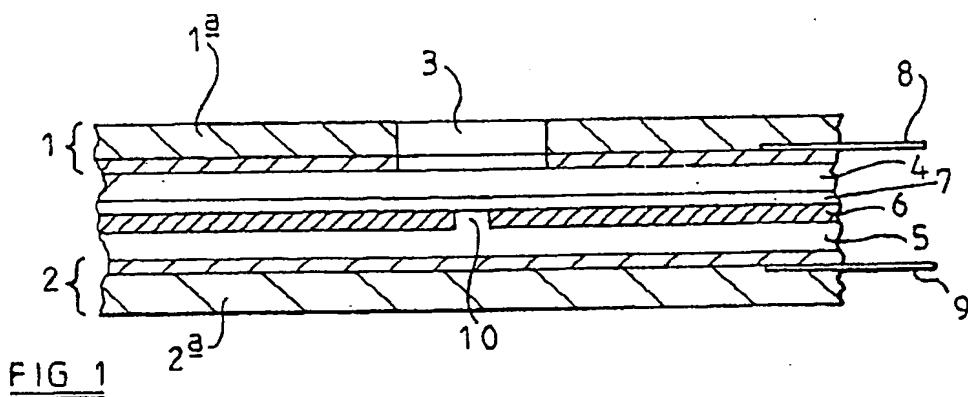
測定

測定のために、上記手順で作った電解二重層セルを電気絶縁箱に入れ、テスト溶液一滴を雲母開口部にかけた。セルの抵抗は、Keithleyモデル175デジタル・マルチメータで測定した。時間の関数としての電流変動を測定するために、1.0 G Ω のトランスインピーダンスのBio-Logic BLM-120二重層膜増幅器を使って、セル電流を電圧に変換した。出力電圧は、Cambridge Electronic Design 1401 Plusマルチチャネル・アナライザでデジタル化し、CDRプログラムを動作させるコンピュータで運転記録をした。

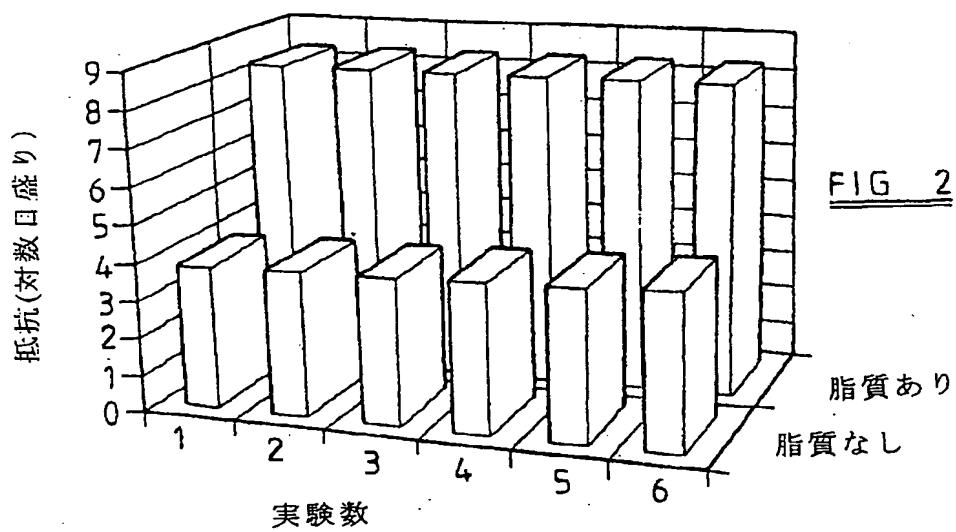
図2は、脂質膜なしでおこなった測定結果と比較した、上記のとおりに準備したセルの抵抗の6回の測定結果を示す。示されているとおり、脂質膜の効果は、測定抵抗をかなり増すことである。

図3は、グラミシジン-Dの1 g/l溶液に長い間さらした後に、上記のように準備したセルの測定抵抗値を示す。タンパク質の効果は、セル抵抗を減らすことである。

【図1】



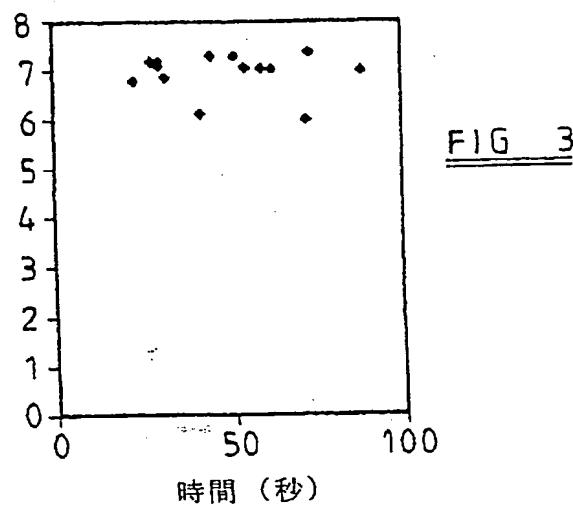
【図2】



(10)

特表2002-505007

【図3】

FIG 3

代替シート (ルール26)

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成11年6月1日(1999.6.1)

【補正内容】

請求の範囲

1. 多孔質ゲルの最初の層が脂質膜の最初の面に塗布され、多孔質ゲルの二番目の層が脂質膜の二番目の面に塗布される、一対の電極の間に配置された脂質膜の最初の面に塗布されるサンプルの分析分子の存否を感知しうるゲート・イオンチャネルを含む脂質膜から成るバイオセンサー。
2. ゲルがヒドロゲルである請求の範囲1に記載のバイオセンサー。
3. ゲルの最初の層が、約1kDの生体分子の拡散を5分未満で起こさせうるよう、上記請求の範囲の何れか一つに記載のバイオセンサー。
4. 脂質膜の脂質がC₁₂₋₂₂の長鎖の炭化水素尾部を持つ、上記請求の範囲の何れか一つに記載のバイオセンサー。
5. 二つの平面電極のそれぞれに一層の多孔質ゲルを塗布し、脂質溶液を多孔質ゲル層の一つにかけ、次に一つの電極を他方の上にのせて、ゲル層がそれらの間に配置されて脂質膜で分離されるようにすることから成るバイオセンサー組み立て法。
6. 脂質膜形成の前に、ゲート・イオンチャネルを定義する膜形成脂質と分子を溶媒で溶かす、請求の範囲5に記載の方法。
7. 溶媒がクロロホルムである、請求の範囲6に記載の方法。
8. 脂質膜の形成の前に、ゲート・イオンチャネルを定義する膜形成脂質と分子が、アルカンに富む連続相の転相乳剤に組み込まれる、請求の範囲5に記載の方法。
9. このアルカンがヘキサンである、請求の範囲8に記載の方法。
10. 請求の範囲1～4に記載の何れかのバイオセンサーで多孔質ゲルの最初の層にサンプルを塗布することから成る、サンプルの分析分子を定質的・定量的に測定する方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		National Application No PCT/GB 98/01738
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N27/327 G01N33/543 C12Q1/00		
According to International Patent Classification(IPC) or to both nations' classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I. NOVOTNY ET AL: "Stabilized bilayer lipid membranes (BLMs) on agar-thin film electrode system support." MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C, vol. 5, no. 1, 1997, pages 55-58, XP002080056 see the whole document --- X. NEUMANN-SPALLART ET AL: "immobilization of active facilitated glucose transporters (GLUT-1) in supported biological membranes." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 68, no. 3, 1997, pages 153-169, XP002080057 see the whole document --- ---/---	1-11 1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 9 October 1998		Date of mailing of the international search report 22/10/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentdienst 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/GB 98/01738

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	D. ANRATHER ET AL: "biorecognition - gated ion channel biosensors - membranes supported by poly-1,2-diaminobenzene-" PROCEEDINGS OF BIOMEDICAL SENSING AND IMAGING TECHNOLOGIES (PROGRESS IN BIOMEDICAL OPTICS), vol. 3253, January 1998, pages 2-11, XP002080058 see abstract	1-11
A	G. PUU ET AL: "Retained activities of some membrane proteins in stable lipid bilayers on a solid support." BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, vol. 10, 1995, pages 463-476, XP002080059 cited in the application see the whole document	1,6
A	US 5 111 221 A (FARE THOMAS L ET AL) 5 May 1992 see column 4, line 3 - column 5, line 21; examples	1,6
A	WO 95 08637 A (UNIV WASHINGTON) 30 March 1995 see page 2, line 18 - page 3, line 6	1,6
A	WO 89 01159 A (COMMW SCIENT IND RES ORG) 9 February 1989 see page 5 - page 10; claim 36	1,6
A	WO 92 17788 A (AUSTRALIAN MEMBRANE & BIOTECH) 15 October 1992 see the whole document	1,6
A	WO 93 21528 A (EUROP I OF TECHNOLOGY ; LANG HOLGER (DE); KOENIG BERND (CH); VOGEL) 28 October 1993 see the whole document	1,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No
PCT/GB 98/01738

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5111221 A	05-05-1992	US	5225374 A	06-07-1993
WO 9508637 A	30-03-1995	US	5736342 A	07-04-1998
WO 8901159 A	09-02-1989	AT	113724 T	15-11-1994
		AU	2127988 A	01-03-1989
		CA	1335879 A	13-06-1995
		DE	3852036 D	08-12-1994
		DE	3852036 T	09-03-1995
		EP	0382736 A	22-08-1990
		JP	2682859 B	26-11-1997
		JP	3503209 T	18-07-1991
		US	5693477 A	02-12-1997
		US	5741712 A	21-04-1998
		US	5766960 A	16-06-1998
		US	5436170 A	25-07-1995
WO 9217788 A	15-10-1992	AU	666113 B	01-02-1996
		CA	2106966 A	28-09-1992
		EP	0639269 A	22-02-1995
		JP	2695044 B	24-12-1997
		JP	6506061 T	07-07-1994
		US	5401378 A	28-03-1995
WO 9321528 A	28-10-1993	AT	143730 T	15-10-1996
		DE	69305160 D	07-11-1996
		DE	69305160 T	30-04-1997
		EP	0637384 A	08-02-1995
		JP	7508342 T	14-09-1995
		US	5756355 A	26-05-1998

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ
, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR,
NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, L
S, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ
, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL
, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, E
E, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU
, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, M
D, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL
, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, U
Z, VN, YU, ZW